

518,727

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Dezember 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/001420 A2

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/006391**
- (22) Internationales Anmeldedatum:
17. Juni 2003 (17.06.2003)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität: **20 Dec 04**
102 27 599.8 20. Juni 2002 (20.06.2002) **DE**
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **PROTEOME FACTORY AG [DE/DE];** Dorotheen-
strasse 94, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **HUMBOLDT-UNI-
VERSITÄT ZU BERLIN [DE/DE];** Unter den Linden
6, 10099 Berlin (DE). **KRAUSE, Martin [DE/DE];**
Wielandstrasse 44, 10625 Berlin (DE). **SCHULER,
Christian [DE/DE];** Teltower Damm 227B, 14167 Berlin
(DE). **BÖTTGER, Ulrike [DE/DE];** Mühlbergstrasse 15,
12487 Berlin (DE). **WEISSHOFF, Hardy [DE/DE];** Gür-
telstrasse 10, 13088 Berlin (DE). **LINSCHIED, Michael
[DE/DE];** Lipaer Strasse 12 a, 12203 Berlin (DE).
- (81) Bestimmungsstaaten (national): **AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU,
SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**
- (84) Bestimmungsstaaten (regional): **ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**
- Veröffentlicht:
— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

WO 2004/001420 A2

(54) Title: **METHOD AND REAGENT FOR SPECIFICALLY IDENTIFYING AND QUANTIFYING ONE OR MORE PRO-
TEINS IN A SAMPLE**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND REAGENZ ZUR SPEZIFISCHEN IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG
VON EINEM ODER MEHREREN PROTEINEN IN EINER PROBE**

(57) Abstract: The invention relates to the MeCAT (metal chelate complex-coded affinity tag) method, and to a reagent suited for carrying out this method. Said reagent contains a reproducible systematic, qualitative and quantitative proteomic characterization with the aid of non-isotope metal-coded markers and, among other things, the latest mass spectrometric tandem methods.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft das MeCAT (Metal-chelate-complex-coded-affinity-tag) Verfahren und ein zu dessen Durchführung geeignetes Reagenz, das eine reproduzierbare systematische, qualitative und quantitative Proteomcharakterisierung mit Hilfe von nicht-Isotop metallkodierten Markern und u.a. modernsten massenspektrometrischen Tandem-Methoden beinhaltet.

Verfahren und Reagenz zur spezifischen Identifizierung und Quantifizierung von einem oder mehreren Proteinen in einer Probe

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und ein zu dessen Durchführung geeignetes Reagenz, das eine reproduzierbare systematische, qualitative und quantitative Proteomcharakterisierung mit Hilfe von nicht-Isotop metallkodierte Markern und u.a. modernsten massenspektrometrischen Tandem-Methoden beinhaltet.

Hintergrund der Erfindung

Einer der weitreichendsten Erfolge des 20. Jahrhunderts war die Entdeckung der DNS als Träger aller Erbanlagen und die Aufklärung ihrer Eigenschaften und dreidimensionalen Struktur. Die erste komplette DNS-Sequenz eines Organismus, wurde im Jahre 1977 von Fred Sanger publiziert. Seitdem erfuhr die Genom-Forschung einen ungeheuren Aufschwung durch die Entwicklung neuer Technologien und automatisierter Hochdurchsatzverfahren, welche heute die Sequenzierung des kompletten Genoms eines Mikroorganismus zur Routine machen.

Nun steht die Biochemie vor einer neuen, weitaus größeren Herausforderung: die enorme Flut von Genomdaten, die in riesigen elektronischen Bibliotheken gespeichert wird, muß in einen funktionellen Zusammenhang gestellt, der genetische Code in nützliche Information umgewandelt werden. Die Einsicht, daß es unmöglich ist, die Kompliziertheit biologischer Prozesse nur mit Hilfe der Genomanalyse zu klären, hat einen weiteren Wissenschaftszweig der molekularen Zellbiologie auf den Plan gerufen, die Proteom-Forschung. Denn die Genprodukte, d.h. die über die Gene verschlüsselten Proteine, sind die eigentlichen biologischen Effektormoleküle, die in das biologische Geschehen eingreifen, dynamische Prozesse steuern, vielfältige Funktionen ausüben. Erst über sie läßt sich verstehen, wie das menschliche Genom und zelluläre Prozesse funktionieren und auch Krankheiten entstehen.

Als Zweig der Wissenschaft befaßt sich Proteom-Forschung („Proteomics“) mit der systematischen Identifizierung aller Proteine, die in einer Zelle oder einem Gewebe exprimiert wurden und der Charakterisierung ihrer wesentlichen Eigenschaften, wie z.B. Menge, Grad der

Modifizierung, Einbindung in Multi-Protein-Komplexe, etc. Es werden Proteindatenbanken bzw. Zellkarten erstellt, in denen Proteinsequenzen archiviert werden. Inzwischen sind viele tausend Sequenzen mit oftmals bekannter Funktion verfügbar.

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt erreicht jedoch keine der angewendeten analytischen Protein-technologien den hohen Durchsatz und das Automatisierungsniveau der Gentechnologie. Es ist weiterhin unwahrscheinlich, daß eine analoge Protein-Vervielfältigung, wie die PCR, in der Proteom-Forschung jemals möglich sein wird. Vielmehr bietet sich hier die Möglichkeit einer Proteinanreicherung an, wobei die interessanten Proteine aufgrund spezifischer Eigenschaften extrahiert bzw. angereichert werden. Z.B. können physikalische Merkmale, wie die Löslichkeit oder die Fähigkeit, an spezifische Liganden zu binden, ausgenutzt werden.

Die Verwendung der Proteomanalyse als schnelle und parallele Methode verglichen mit klassischer Proteinchemie findet in der biologischen Grundlagenforschung, der Biotechnologie und der medizinischen Forschung mehr und mehr Eingang. Es ist damit zu rechnen, daß diese Analytik in wenigen Jahren standardmäßig etabliert sein wird. Wie effektiv eine Proteomanalyse tatsächlich durchgeführt werden kann, hängt in entscheidendem Maße davon ab, wie gut man mit Hilfe der analytischen Methoden in der Lage ist, sogenannte „low-copy“ Proteine zu identifizieren und zu quantifizieren, da gerade diese häufig eine entscheidende biologische Rolle im Zellgeschehen spielen.

Die nach wie vor meist angewendete und zuverlässigste Methode der Proteomanalyse ist die zweidimensionale Gelelektrophorese (2DGE), an die sich die sequentielle Identifizierung der getrennten Proteinspezies anschließt. Zu wissenschaftlicher Signifikanz gelangte diese Herangehensweise durch enorme Technologiefortschritte in der Massenspektrometrie und Bioinformatik. Diese erst seit kurzem verfügbare, hochempfindliche MS-Technik hat es ermöglicht, auch geringste Protein- oder Peptidmengen, die mit Hilfe von konventionellen Anfärbemethoden sichtbar gemacht werden können, im Femtomolbereich zu detektieren und über Tandem-Techniken auch zu identifizieren. Dies sind vor allem die matrixassistierte Laser-desorptions/Ionisations (MALDI) time-of-flight (TOF)-MS und die Elektrospray-ionisations- (ESI)-MS. Tandem-MS-Instrumente wie das Triple-Quadrupole-Gerät, Ion-Trap und das Hybrid Quadrupol-time-of-flight (Q-TOF)-Gerät werden routinemäßig in LC-MS/MS- oder Nanosprayexperimenten mit Elektrospray-Ionisierung (ESI) eingesetzt, um Peptidfragment-Ionenspektren zu erzeugen, die für die Proteinidentifizierung über eine Datenbank-

Sequenzsuche geeignet sind.

Die Protein- bzw. Genomdatenbanksuche ist ein ebenso wichtiges Werkzeug, dem die Proteomforschung ihre Fortschritte zu verdanken hat. Die entwickelten Computersuchalgorithmen sind inzwischen sehr ausgefeilt. Goodlett *et al.* konnte zeigen, daß die genaue Masse eines Peptids, zusammen mit einschränkenden Suchkriterien wie dem Molekulargewicht des Proteins, von dem das Peptid stammt und der Angabe der spezifischen Protease zur Spaltung des Proteins, ausreichen kann, um ein Protein durch eine Datenbanksuche eindeutig zu identifizieren. Der hohe Arbeitsaufwand und die oftmals laborübergreifende Nicht-Reproduzierbarkeit der 2DGE-Technik macht es jedoch nahezu unmöglich, diese Methode zu automatisieren. Gegenwärtig gibt es keine, dem Niveau der Genomtechnologie vergleichbare, analytische Technologie auf dem Gebiet der Proteomforschung. Während man mit Hilfe dieser Methoden wohl in der Lage ist, die Komponenten eines Proteingemisches zu analysieren, sind sie leider weder geeignet, die exakte Menge noch den Aktivitätszustand der Proteine in der Mischung zu bestimmen. Ohne einen vorherigen Anreicherungsschritt ist es praktisch nicht möglich, Proteine, die nur in sehr geringen Mengen vorkommen, wie beispielsweise Regulatorproteine, nachzuweisen. Aus diesem Grunde und wegen weiterer bekannter Nachteile der 2DGE sucht man verstärkt nach alternativen Methoden, die eine weitestgehende Unabhängigkeit von der 2DGE als Trennmethode erlauben.

Gelfreie Systeme erregen zunehmend das Interesse der Proteomforscher. Es lassen sich zahlreiche unterschiedliche gelfreie Systeme erdenken, die alle auf der Kombination zweier oder mehrerer unterschiedlicher chromatographischer Trennverfahren beruhen. Die chromatographische Trennung von Proteinen ist ein zentraler Bestandteil jeglicher Proteinforschung und somit ein naheliegendes Verfahren in der Proteomforschung. Dank der langjährigen Entwicklung und Optimierung zeichnen sich chromatographische Trennungen durch hohe Reproduzierbarkeit aus. Allerdings hat selbst die Kombination zweier unterschiedlicher chromatographischer Verfahren nicht das in der Proteomforschung benötigte Trennvermögen, da komplexe Proteingemische aufgrund ihrer Eigenschaften schwierig in einzelne aufgereinigte Proteinfractionen zu trennen sind. Eine Kopplung der Chromatographie an die Massenspektrometrie bringt mit der Massenanalyse ein weitere Trenndimension, die allerdings auf Proteine angewendet nur einen sehr begrenzten Nutzen bringt. Erst bei der Analyse von Peptiden, wie unten aufgeführt, ist dieser Ansatz erfolgversprechend.

In der WO 00/11208 wird eine interessante Alternativmethode für die Proteomanalyse offenbart, die sich besonders für die quantitative Analyse der Proteinexpression in komplexen biologischen Proben, wie Zellen und Geweben, für den Nachweis und die Quantifizierung spezifischer Proteine in komplexen Proteingemischen sowie für die quantitative Bestimmung spezifischer Enzymaktivitäten eignet. Sie bedient sich einer neuen Klasse chemischer Reagenzien, codierten Affinitätstags (CATs), in diesem Fall den sogenannten isotopencodierten Affinitätstags (ICATs) und massenspektrometrischer Methoden.

Das ICAT-Reagenz besteht aus dem Affinitätstag, das selektiv an ein entsprechendes Gegen-Reagenz nichtkovalent bindet und eine säulenchromatographische Trennung der mit dem Affinitätstag markierten Peptide oder Substrate vom übrigen Gemisch erlaubt. Das Affinitätstag ist über einen Linker, der Isotopen-markiert sein kann, mit einer reaktiven Gruppe verknüpft, die selektiv mit einer spezifischen Proteinfunktion reagiert.

Auf diese Weise werden die Proteine, nachdem sie aus den Zellen isoliert wurden, an spezifischen Bindungsstellen durch das ICAT-Reagenz markiert. Hier handelt es sich z.B. um eine funktionelle Gruppe, die eine spezifische Reaktivität für Sulfhydrylgruppen besitzt und ausschließlich an Cystein-haltige Proteine bindet. Aus dem im Anschluß nach enzymatischer Hydrolyse erhaltenen Peptidgemisch werden nur die Cystein-haltigen Peptide selektiv isoliert, dies bedeutet eine wesentliche Vereinfachung der Komplexität des erhaltenen Peptidgemischs, da weniger als ein Zehntel aller Peptide, die beispielsweise durch tryptische Spaltung aus dem gesamten Hefeproteom hervorgegangen sind, einen Cystein-haltigen Rest enthalten. Ein weiterer wesentlicher Vorteil ist, daß auf diesem Wege Proteine, die in nur sehr geringen Mengen auftreten, angereichert werden können. Trotz der starken Vereinfachung der Komplexität des Systems ist aber die Quantifizierung und Identifizierung der Proteine garantiert.

Um relative Mengen an Proteinen in einer oder in mehreren Proteinproben quantitativ zu bestimmen, benutzt man nun unterschiedlich isotopencodierte ICAT-Reagenzien. Jede Probe wird mit einem unterschiedlich isotopenmarkierten, sonst aber chemisch identischen ICAT-Reagenz behandelt. Die Proben, die beispielsweise aus Zellkulturen einer Spezies in unterschiedlichen Entwicklungsphasen stammen können, werden im Anschluß vereinigt und enzymatisch hydrolysiert. Die markierten Peptide werden affinitätschromatographisch vom Gemisch abgetrennt und über HPLC aufgetrennt. Ein Paar identischer, aber aus verschiedenen Proben stammender Peptide wird gleichzeitig von der HPLC-Säule eluiert. Im Massenspek-

trum besitzen diese Peptide jedoch nicht das gleiche Masse-Ladungs-Verhältnis, sondern sie unterscheiden sich durch die charakteristische Massendifferenz der unterschiedlich isotopenmarkierten Tags. Im Verhältnis der relativen Ionenintensitäten eines solchen (CAT-markierten) Peptidpaares im Massenspektrum wird das relative Mengenverhältnis der Stammproteine aus den Ursprungszellen bzw. -gewebe quantitativ widergespiegelt. Mit Hilfe eines Tandem-Massenspektromeiers (MS/MS) wird dann die Peptidsequenz des ICAT-markierten Peptides durch Fragmentierung bestimmt. Die Proteinidentifizierung erfolgt über eine computergestützte Genom- bzw. Proteindatenbanksuche anhand der aufgezeichneten Sequenzinformation.

Trotz aller wesentlichen Vorteile des ICAT-Verfahrens bestehen bei der Durchführung dieses Verfahrens immer noch einige Nachteile, die seine Anwendung im Bereich der Hochdurchsatzanalyse behindern und erschweren. Es müssen Isotope eingesetzt werden, die die Synthesekosten der Verbindungen deutlich erhöhen und nur in begrenztem Maße zu erschwinglichen Preisen erhältlich sind, was die Flexibilität des Verfahrens weiter einschränkt.

Es ist daher Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes CAT-basiertes Verfahren zur Verfügung zu stellen, das eine Anwendung von CAT in einer Hochdurchsatz-Umgebung erlaubt. Es ist eine weitere Aufgabe, ein für dieses Verfahren spezifisch geeignetes CAT-Reagenz zur Verfügung zu stellen.

Gemäß einem ersten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird diese Aufgabe durch ein Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von einem oder mehreren Proteinen in einer Probe, die ein Gemisch von Proteinen enthält, gelöst. Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt die Schritte von: a) zur Verfügung stellen einer Probe, die ein Gemisch von Proteinen enthält; b) zur Verfügung stellen eines Reagenz zur Analyse von Peptiden, das die allgemeine Formel

A-Y-PRG

aufweist, worin A mindestens eine funktionelle Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial darstellt, die mindestens eine Affinitätsfunktion für die selektive Bindung an ein Trägermaterial umfaßt, Y eine Gruppe ist, die mindestens eine Chelatfunktion für nicht-Isotop Metalle umfaßt, und PRG eine reaktive Gruppe zur

selektiven Bindung an Peptide oder andere zu analysierende Biomoleküle ist, c) Spaltung der Proteine in der Probe, um Peptide zu erzeugen; d) Kopplung der Peptide mit dem Reagenz aus Schritt b), e) Selektion der in Schritt d) markierten Peptide unter der Verwendung der reversiblen Bindung an ein Trägermaterial oder der Affinitätsmarkierung durch Bindung an ein Trägermaterial und Entfernung von nicht-gebundenen Peptiden, f) Freisetzen der gebundenen Peptide von dem Trägermaterial und Elution von der Matrix; und g) Nachweisen und Identifizieren der markierten Peptide durch Massenspektrometrie.

Das Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung dient der differentiellen Untersuchung des Proteoms von einem, zwei oder mehr Zell-, Gewebe- oder Körperflüssigkeitsproben während einer Analyse. Weiterhin können aber auch andere Protein-haltige Proben untersucht werden, so zum Beispiel Proteinfractionen von Organellen oder anderen Kompartimenten von Zellen. Das Verfahren ist eine neuartige Alternative zur ICAT-Methode (Isotope-coded affinity tags), die oben genannt ist und vermeidet einige der Nachteile von ICAT. Es stellt eine neue alternative und komplementäre Technologie für die Proteom-Forschung dar. Das Verfahren der vorliegenden Erfindung wird im folgenden als MeCAT (Metal-chelate-complex-coded-affinity-tag) bezeichnet.

Beim MeCat-Verfahren werden Peptid/Protein-Proben mit einem MeCAT-Reagenz umgesetzt, das folgende Kerneigenschaften besitzt:

- reaktive Gruppen zur Kopplung an Proteine/Peptide oder andere Biomoleküle, im folgenden auch mit „PRG“ bezeichnet;
- mindestens ein chelatbildender Komplex zur (möglichst stabilen) Komplexierung von Metallen, insbesondere isotonenarmen Metallen, im folgenden auch mit „Y“ bezeichnet; und
- mindestens eine Affinitätsfunktion (z.B. Biotin) oder weitere reaktive Gruppe/n zur Kopplung an Trägermaterialien, feste Phasen oder andere Verbindungen (z.B. SH-Gruppe), im folgenden auch mit „A“ bezeichnet.

Anstelle einer Markierung mit unterschiedlichen Isotopen werden die zu vergleichenden Proben mit MeCAT-Reagenzien umgesetzt, welche sich in den chelatgebundenen Metallionen unterscheiden. Anschließend erfolgt z.B. eine Affinitätsaufreinigung der markierten Biomoleküle, bspw. über Biotin - Streptavidin, oder ein „Fischen“ durch spezifische chemische Umsetzung mit einem Trägermaterial mit späterer Wiederfreisetzung.

Im nächsten Schritt werden die markierten Biomoleküle durch multi-dimensionale Chromatographie getrennt und anschließend einer on-line oder off-line Differentialanalyse mit relativer Quantifizierung der Protein/Peptidmenge durch Massenspektrometrie unterzogen. Die korrespondierenden Peptide der einzelnen Proben sind je nach dem eingesetzten Metall unterschiedlich schwer markiert und können so in Verbindung mit einer Sequenzanalyse (Identifizierung) der Biomoleküle (Peptide) durch MS" den einzelnen Proben quantitativ zugeordnet werden.

Bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, wobei die Spaltung der Peptide enzymatisch oder chemisch durchgeführt wird. Die Spaltung kann eine Hydrolyse unter der Verwendung von bekannten Proteasen, wie zum Beispiel Trypsin, Asp-N-Protease, Pepsin, Lys-C, Glu-C, Arg-C Proteinase, Asp-N Endopeptidase, BNPS-Skatole, Caspasen, Chymotrypsin, Clostripain, Faktor Xa, Glutamyl-Endopeptidase, GranzymB, Prolin-Endopeptidase, Proteinase K, Staphylokokken-Peptidase A, Thermolysin, Thrombin, Carboxypeptidasen und Kombinationen davon geeignet durchgeführt werden. Die chemische Spaltung kann mittels partieller Säurehydrolyse CNBr, Ameisensäure, Jodosobenzoesäure, NTCB (2-Nitro-5-thiocyanobenzoesäure), Hydroxylamin und Kombinationen davon durchgeführt werden.

Weiterhin ist ein erfindungsgemäßes Verfahren bevorzugt, wobei die markierten Peptide nach der Freisetzung von dem Trägermaterial und vor ihrer massenspektrometrischen Analyse chromatographisch voneinander getrennt werden, insbesondere durch HPLC. Die chromatographische Technik wird je nach gewünschtem Auflösungsgrad gewählt.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren, das dadurch gekennzeichnet ist, daß mehrere Protein- und/oder Peptide enthaltende Proben gemeinsam analysiert werden. Dies kann insbesondere durch die unterschiedliche Markierung von verschiedenen Proben aus verschiedenen Zellmaterialien erreicht werden.

Besonders bevorzugt ist bei den erfindungsgemäßen Verfahren, daß die markierten Peptide einer anschließenden Sequenzierung unterzogen werden. Mit der Sequenzinformation der markierten Peptide können dann Datenbanken durchsucht werden, um Rückschlüsse auf das Stammprotein schließen zu können.

In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Nachweis der relativen Expression von Proteinen in einer Proteine enthaltenden Probe zur Verfügung gestellt, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt von: a) Zur Verfügung stellen einer biologischen Probe, die Proteine enthält; b) Zur Verfügung stellen eines Reagenz zur Analyse von Peptiden, das die allgemeine Formel

A-Y-PRG

aufweist, worin A mindestens eine funktionelle Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial darstellt, Y eine Gruppe ist, die mindestens eine Chelatfunktion für Metalle umfaßt, und PRG eine reaktive Gruppe zur selektiven Bindung an Peptide oder andere zu analysierende Biomoleküle ist; c) Spaltung der Proteine in der Probe, um Peptide zu erzeugen; d) Kopplung der Peptide mit dem Reagenz aus Schritt b); e) Selektion der in Schritt d) markierten Peptide unter Verwendung mindestens einer funktionellen Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial und Entfernung von nicht gebundenen Peptiden; f) Freisetzen der affinitätsgebundenen Peptide von dem Trägermaterial und Elution von der Matrix; und g) Nachweisen und Identifizieren der markierten Peptide mittels Massenspektrometrie, und h) Messen der relativen Anwesenheit der verschiedenen markierten Peptide als getrennte Ionenpeaks, um die relative Expression des Proteins zu bestimmen, von dem die affinitätsmarkierten Peptide abstammen. Anhand des analysierten Expressionsmusters lassen sich in bisher unerreichter Auflösung Rückschlüsse auf die verschiedenen Zustände von Zellen ziehen oder diagnostische Parameter erhalten, die von Protein-enthaltenden Probe abgeleitet sind.

In einem weiteren Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Anordnung der Gruppen A, X und PRG vertauscht sein. In der Tat kann das erfindungsgemäße Reagenz in seinen verschiedenen Bestandteilen verschieden orientiert vorliegen, solange wie alle funktionellen Erfordernisse zur Durchführung von MeCAT immer noch vorhanden sind.

Bevorzugterweise werden die markierten Peptide in dem erfindungsgemäßen Verfahren mittels Tandem-Techniken, wie zum Beispiel matrixassistierte Laserdesorptions/Ionisations (MALDI) time-of-flight (TOF)-TOF-MS und die Elektrospray-ionisations-(ESI)-MS nachgewiesen. Dabei kann ein interner Standard bei der Analyse verwendet werden, der in die Probe eingefügt werden kann.

Die Erfindung umfaßt sowohl das MeCAT-Verfahren als auch die Synthese der neuartigen MeCAT-Verbindungen. So wird gemäß einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung ein Reagenz für die massenspektroskopische Analyse von Peptiden zur Verfügung gestellt, das die allgemeine Formel:

A-Y-PRG

aufweist, worin A mindestens eine funktionelle Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial darstellt, Y eine Gruppe ist, die mindestens eine Chelatfunktion für isotopenarme Metalle umfaßt, und PRG eine reaktive Gruppe zur selektiven Bindung von Peptiden oder anderen zu analysierenden Biomolekülen ist, die analysiert werden sollen.

In einem alternativen Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung kann die Anordnung der Gruppen A, X und PRG vertauscht sein. In der Tat kann das erfindungsgemäße Reagenz in seinen verschiedenen Bestandteilen verschieden orientiert vorliegen, solange wie alle funktionellen Erfordernisse zur Durchführung von MeCAT immer noch erfüllt sind.

Bevorzugterweise ist die Funktion PRG ausgewählt aus einer Sulfhydryl-reaktiven Gruppe, einer Amin-reaktiven Gruppe und einem Enzymsubstrat. Weiter bevorzugt ist, daß PRG ausgewählt ist aus der Gruppe von einer Amin-reaktiven Pentafluorphenylestergruppe, einer Amin-reaktiven N-Hydroxysuccinimidestergruppe, Sulfonylhalid, Isocyanat, Isothiocyanat, aktivem Ester, Tetrafluorphenylester, einem Säurehalid und einem Säureanhydrid, einer Homoserin Lacton-reaktiven primären Amingruppe, und einem Carboxylsäure-reaktiven Amin, Alkohol oder 2,3,5,6-Tetrafluorphenyltrifluoracetat, einer Jodacetylamidgruppe, einem Epoxid, einer α -Haloacylgruppe, einem Nitril, einem sulfonierten Alkyl, einem Arylthiol und einem Maleimid.

Besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Reagenz, worin A ausgewählt ist aus Biotin oder modifiziertem Biotin, einem 1,2-Diol, Glutathion, Maltose, einer Nitrilotriessigsäuregruppe, einem Oligohistidin oder einem Hapten. Im Falle von Biotin kann so zum Beispiel das Reagenz an eine Streptavidin-Gruppe angekoppelt werden, um so bequem isoliert werden

zu können. Besonders bevorzugt ist dabei die Verwendung einer Streptavidin-markierten Säulenmatrix oder beschichtete Perlen („beads“).

In einer weiteren Ausführungsform ist A eine an ein Trägermaterial gekoppelte reaktive Gruppe, die wieder vom Trägermaterial abgespalten werden kann. In Frage kommen u.a. Disulfid-Bindungen (S-S), die wieder reduziert und damit gespalten werden können, oder photoempfindliche Bindungen, die durch Lichteinwirkung gespalten werden können.

In einer weiteren Ausführungsform eines erfindungsgemäßen Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung umfaßt dieser einen chemisch und/oder enzymatisch spaltbaren Linker zwischen den Gruppen A, X und/oder PRG. Im allgemeinen kann dieser Linker aus CH₂-Gruppen aufgebaut sein, die sich zwischen den Gruppen A, X und/oder PRG befinden und diese miteinander verbinden. Eine oder mehrere der CH₂-Gruppen kann substituiert sein, wobei der Charakter der Substitutionen nicht relevant ist, solange wie die Funktionen der Gruppen A, Y und PRG nicht beeinflußt werden. Vorteilhafterweise können über die Linker jedoch andere Funktionen eingefügt werden, wie zum Beispiel die oben genannte chemische und/oder enzymatische Spaltbarkeit. Mögliche Substitutionen sind Alkyl-, Alkenyl- und Alkoxy-Gruppen, Arylgruppen, die mit einer oder mehrerer Alkyl-, Alkenyl- und Alkoxy-Gruppen, Arylgruppen substituiert sind, saure Gruppen und basische Gruppen. Weiterhin können Doppel- und Dreifachbindungen im Linker vorhanden sein und Heteroatome, wie zum Beispiel O, S und N, eingefügt sein, wie zum Beispiel in Form eines Linkers, der eine Disulfidgruppe enthält.

Eine wesentliche Funktion des Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung ist dessen chelatbildende Funktion. Bei bevorzugten Reagenzien gemäß der vorliegenden ist Y ausgewählt aus einem makrozyklischen Lanthanoid-Chelatkomplex, einem funktionalisierten Tetraazamacrozyklus, einer Polyazapolyessigsäure, DOTA, einem DOTA-Derivat, NOTA, einem NOTA-Derivat, EDTA, DTPA-BP, DTPA, DO3A, HP-DO3A und DTPA-BMA. Besonders bevorzugte Verbindungen sind 1,4,7,10,13,16,19,22-Oktaazacyclotetracosan-1,4,7,10,13,16,19,22-oktaessigsäure (OTEC) und 1,4,7,10,14-17,20,23-Oktaazacyclohexacosan-1,4,7,10,14,17,20,23-oktaessigsäure (OHEC).

Die Metalle, die mit der chelatbildende Funktion des Reagenz der vorliegenden Erfindung gebunden werden können, können aus einer Vielzahl von Metallen ausgewählt werden, was

die Flexibilität bei der Verwendung des Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung entscheidend verbessert. So kann das durch den Chelatkomplex gebundene Metall ausgewählt sein aus Ag, Al, As, Au, Be, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Hg, Ho, In, La, Li, Lu, Mn, Na, Nd, Ni, Pb, Pr, Rb, Rd, Sb, Sm, Sn, Tb, Tl, Tm, V, W, Y, Yb und Zn. Erfindungsgemäß kann die chelatbildende Gruppe mit mehreren verschiedenen Metallen markiert sein.

Ein anderer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Verwendung des erfindungsgemäßen Reagenz zum Nachweis von Peptiden in einer biologischen Probe und/oder der relativen Expression von Proteinen in einer Proteine enthaltenden Probe. Dabei kann es sich bei der biologischen Probe um eine direkt entnommene oder vorfraktionierte Probe zur differentiellen Untersuchung des Proteoms von einem, zwei oder mehr Zell-, Gewebe- oder Körperflüssigkeitsproben handeln. Weiterhin können aber auch andere Protein-haltige Proben untersucht werden, so zum Beispiel Proteinfractionen von Organellen oder anderen Kompartimenten von Zellen. Das Verfahren wird bevorzugt im Zuge einer Diagnose oder die Überwachung von Erkrankungen eines Tieres, insbesondere des Menschen, durch Nachweis der relativen Expression von Proteinen in einer von dem Tier entnommenen und Proteine enthaltenden Probe angewendet. Durch die Analyse und Aufdeckung von differentiell exprimierten Proteinen können Rückschlüsse auf Proteine erhalten werden, die bei Erkrankungen auf zellulärer Ebene eine Rolle spielen und die als „Targets“ für therapeutische Substanzen dienen können oder für die Diagnose und Überwachung einer Therapie fungieren können.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Analysesatz (Kit) zur Diagnose, der mindestens ein Reagenz gemäß der vorliegenden Erfindung zusammen mit weiteren zum Nachweis von Peptiden in einer biologischen Probe und/oder der relativen Expression von Proteinen in einer Proteine enthaltenden Probe geeigneten Substanzen und/oder Enzymen, insbesondere einen internen Standard, enthält. Mittels dieses Kits kann z.B. eine Proteommarkierung durchgeführt werden, deren Produkte dann an ein zentrales Analyselabor zur massenspektrometrischen Analyse geschickt werden können.

In einer weiteren Variante des erfindungsgemäßen Verfahrens ist der Einsatz radioaktiver Metallionen denkbar, der eine besonders empfindliche Detektion, z.B. durch Szintillationsmessung ermöglicht. Die entsprechenden Ionen sind dem Fachmann im Gebiet der Radiochemie bestens bekannt und können aus jedem herkömmlichen Lehrbuch der Chemie, wie

zum Beispiel dem Römpp-Lexikon Chemie, 10. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart, entnommen werden.

Aus der Sicht des Chemikers sind durch das ICAT-Verfahren längst nicht alle Möglichkeiten der schnellen quantitativen Protein- bzw. Proteinfunktionsanalyse ausgeschöpft. Der Kern dieser hier vorgestellten Reagenzienklasse ist die geschickte Kombination dreier verschiedener Funktionen in einem Molekül; i) die Möglichkeit, spezifisch an ein Protein zu binden, ii) die Möglichkeit einer einfachen Trennung der markierten von den unmarkierten Peptiden nach der enzymatischen oder chemischen Hydrolyse, und iii) die Möglichkeit einer relativen Quantifizierung von Peptidpaaren, die aus verschiedenen Proben (z.B. aus Zellen einer Spezies in verschiedenen Entwicklungsphasen) stammen, über die Massendifferenz korrespondierender Peptide im Massenspektrum.

Die ersten beiden Funktionen werden in vielen gängigen, analytischen Trennmethoden eingesetzt. Die dritte Funktion ist an die modernsten MS-Technologien in Verbindung mit neuesten rechnergestützten Datenbanksuchprogrammen geknüpft, die die Identifizierung eines Proteins anhand der Aminosäuresequenz eines einzigen oder einiger Peptide (beispielsweise cystein-haltige Peptide) möglich machen.

Die Vorteile der Methode liegen auf der Hand: Jede beliebige Menge an Startmaterial kann bearbeitet werden. Auch nur in geringen Mengen auftretende Proteine sind nachweisbar und quantifizierbar, da diese durch eine Cystein-spezifische Selektion angereichert werden. Durch andere, aminosäurespezifische oder substratspezifische funktionelle Gruppen im MeCAT-Reagenz können weitere Proteine in der Analyse sicher erfaßt werden. Die Komplexität des Peptidgemisches wird dadurch reduziert, was einen wesentlich geringeren Arbeitsaufwand und eine schnellere und erfolgreiche Proteinidentifizierung durch Datenbanksuchprogramme mit sich bringt.

Anstelle einer Isotopenmarkierung stellt die vorliegende Erfindung den Einbau eines Metallchelatkompleses in das Reagenz als Alternative zur Verfügung. Ein Konzept, wie diese Reagenzien aufgebaut sein können/ist in den Abb. 1 und 2 veranschaulicht.

Die Synthese eines isotoopenmarkierten Linkers ist sehr teuer und nicht ohne weiteres möglich, denn es steht bekanntlich nur eine sehr begrenzte Auswahl stabiler Isotoopenreagenzien,

die ^2H , ^{13}C und ^{15}N zur Verfügung. Das bedeutet z.B., daß Proben aus einer sehr begrenzten Anzahl Zellkulturen, die unterschiedlichen Bedingungen ausgesetzt wurden, auf den quantitativen und qualitativen Nachweis dynamischer Veränderungen in der Proteinproduktion hin untersucht und verglichen werden könnten. In der Literatur sind Beispiele für den Vergleich zweier Proben mit ^1H - und ^2H -markierten ICATs bekannt.

Metallionen sind in wesentlich größerer Vielfalt und billiger verfügbar. Es kommt nur darauf an, geeignete zu finden und sie geschickt im aminosäurespezifischen Reagenz zu verpacken, ohne daß sie durch Dissoziations- oder Austauschreaktionen verlorengehen können.

Der in Frage kommende Chelatligand muß das Metallion so gut stabilisieren, daß der Komplex während des gesamten Prozesses vollständig intakt bleibt, seine Stabilität auch bei größeren pH-Änderungen garantiert ist und keine Austauschprozesse mit den Peptiden als potentielle Liganden stattfinden können. Die Löslicheigenschaften des Komplexes dürfen sich von denen der anderen Reagenzkomponenten, d.h. der proteinreaktiven funktionellen Gruppe und des Molekülteils für chromatographische Trennzwecke, nicht grundlegend unterscheiden. Das gesamte Molekül muß vorzugsweise in der Probenflüssigkeit löslich sein, um eine effiziente Wechselwirkung des Tags mit den spezifischen Proteinbindungsstellen zu gewährleisten.

Für eine schnelle und eindeutige Proteinidentifizierung kann man in das proteinreaktive Reagenz ein Metallion einfügen, das man in Proteinen normalerweise nicht findet und das ein sehr charakteristisches Isotopenmuster aufweist. Dieses wird man sehr leicht im Massenspektrum des markierten Peptids wiederfinden. Computeralgorithmen können automatisch das experimentell beobachtete Isotopenmuster des Massefragments vergleichen, mit oder ohne die metallionen- bzw. massespezifische Markierung. Dies erfordert keine höheren Ansprüche an die Empfindlichkeit des verwendeten Massenspektrometers. Die an Peptide gebundenen Komplexbildner werden im Gegenteil die Nachweisempfindlichkeit positiv beeinflussen, da normalerweise in der Massenspektrometrie von Peptiden Komplexbildner als starke Kontaminanten bekannt sind und deshalb schon in geringsten Konzentrationen vermieden werden sollten. Über ein automatisches Screening der Massenspektren aller über 2DLC oder eine andere geeignete Methode getrennten Peptide sollte es möglich sein, in einem Peptidgemisch, welches vorwiegend Peptide ohne Cysteinreste enthält, die Cystein-haltigen Peptide aufgrund des speziellen Isotopenmusters sehr schnell und eindeutig zu selektieren. Und nur die genau bestimmte Masse dieser selektierten Peptide wird zur Proteinidentifizierung durch Korrelation

der experimentellen Daten mit denen von Genom- bzw. Proteindatenbanken herangezogen. Eine Sequenzierung der Peptide durch CID-MS ermöglicht die Identifikation.

Für eine relative Proteinquantifizierung und -qualifizierung in mehreren Proteinproben kommen mehrere Metallchelatkomplexe mit identischem Ligandteil, aber mit unterschiedlichen Metallionen in Betracht, die sich in ihrer thermodynamischen Stabilität und in ihrem kinetischen Verhalten so ähnlich sein müssen, daß Metallaustauschprozesse untereinander auszuschließen sind. Die relativen Atomgewichte der Metallionen sollten sich um nicht mehr als 10 Dalton unterscheiden, um im Massenspektrum zusammengehörige Peptidpaare leicht ausfindig machen zu können. Die Metallionen sollten weiterhin isotopenarm sein, um eine Zuordnung nicht unnötig zu erschweren. Neben der proteinreaktiven funktionellen Gruppe kann das metallionenspezifische Reagenz eine Molekülkomponente zur säulenchromatographischen Abtrennung der markierten Peptide nach der Hydrolyse des Proteins besitzen. In Abb. 1 ist die bevorzugte Strategie zur Quantifizierung der Proteinexpression mit Hilfe von metallspezifisch markierten Reagenzien (MeCATs/MeCODs) schematisch dargestellt.

Um das Metallion effizient zu binden, eignen sich als Chelate makrocyclische Liganden besonders gut, da sie sich durch eine hohe thermodynamische Stabilität und kinetische Inertheit hinsichtlich Dissoziation auszeichnen. Auf Grund ihrer topologischen Besonderheiten besitzen Makrocyclen eine Vielzahl strategisch verteilter Donoratome, die bei geeigneter Konformation und Größe des Liganden in effektiver Weise mit dem Metallion wechselwirken können. Eine „statistische Stabilisierung“ folgt aus der sehr geringen Wahrscheinlichkeit für einen gleichzeitigen Bruch aller Metall-Ligand-Donorbindungen. Ähnlich wie bei den Rezeptorbindungsstellen von Enzymen bewirken viele, im einzelnen nur schwache koordinative Wechselwirkungen bei geeigneter molekularer Architektur eine nicht nur stabile, sondern auch selektive Bindung des Metallions. Dadurch wird, im Gegensatz zu offenkettigen Liganden der Austausch mit biologisch relevanten Metallionen wirksam unterbunden (siehe Tabelle 1).

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren und ein zu dessen Durchführung geeignetes Reagenz, das eine reproduzierbare systematische, qualitative und quantitative Proteomcharakterisierung mit Hilfe von nicht-Isotopen metallkodierte Markern und u.a. modernsten massenspektrometrischen Tandem-Methoden beinhaltet.

Der Metallcode ist ein makrocyclischer Lanthanoidchelatkomples auf der Basis von DOTA (1,4,7,10-Tetraazcyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure) oder ein Übergangsmetallkomplex auf der Basis von NOTA (1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-Triessigsäure), der mit einer aminosäurespezifischen funktionellen Gruppe und einer weiteren Molekülkomponente zur chromatographischen Trennung der markierten Peptide ausgestattet sein muß. Der zu synthetisierende Marker muß sich durch gute Wasserlöslichkeit und hohe kinetische Stabilität auszeichnen. Verbindungen mit verschiedenen Lanthanoidionen dürfen sich hinsichtlich ihrer chemischen Reaktivität und physikalischen Eigenschaften nicht signifikant unterscheiden. Die metallcodierten Marker werden hinsichtlich ihrer Struktur, ihrer thermodynamischen Eigenschaften in wäßriger Lösung und ihres Reaktionsverhaltens gegenüber Peptiden charakterisiert. Ihre reproduzierbare Anwendbarkeit in der Proteomanalyse muß an Modellversuchen und Realproben in Verbindung mit mehrdimensionaler Chromatographie, MS/MS und Datenbankanalyse getestet werden.

Die metallkodierte Marker werden „site-spezifisch“ kovalent an die Proteine von Zellysaten gebunden. Im Anschluß an die Proteolyse der Proteine werden die metallmarkierten Peptide chromatographisch isoliert und weiter aufgetrennt, um dann massenspektrometrisch quantifiziert und im zweiten Schritt sequenziert zu werden. Über einen direkten quantitativen Vergleich wohl determinierter Zustände werden Differenzen in der Proteinzusammensetzung herausgestellt, welche schließlich mit biologischen Auswirkungen korreliert werden müssen.

In Verbindung mit einer Datenbanksuche ist es möglich, anhand eines oder nur weniger Peptide die gefragten Stammproteine zu identifizieren.

Auf diesem Gebiet der Koordinationschemie gibt es zahlreiche Arbeiten aus den letzten 15-20 Jahren, auf deren Offenbarung sich im Rahmen der vorliegenden Erfindung ohne weiteres zurückgreifen läßt (siehe Tabelle 1).

Der cyclische Ligand, der vorzugsweise ein funktionalisierter Tetraazamakrocyclus, d.h. ein DOTA-Derivat (1,4,7,10-Tetraazcyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure) oder ein Triazamakrocyclus, ein NOTA-Derivat (NOTA = 1,4,7-Triazacyclononan-1,4,7-Triessigsäure) sein kann, wird entweder aus Aminosäuren aufgebaut oder nach in der Arbeitsgruppe der Anmelder unlängst entwickelten, sehr effizienten, templatgestützten Cyclisierungsreaktionen. Die proteinreaktive Gruppe und die Funktion zur Peptidisolierung (z.B. eine spezielle Aminosäure

zur kovalenten Bindung an eine Säule, die Isothiocyanatgruppen enthält oder Biotin zur Affinitätschromatographie) können in das Kohlenstoffgerüst des makrocyclischen Liganden eingebaut sein, oder der Metallchelatkomplex wird über einen Linker mit der proteinreaktiven Gruppe und der Funktion zur Peptidisolierung geeignet verknüpft.

Als Metallionen für den NOTA-Liganden eignen sich Übergangsmetallionen wie Kupfer(II), Nickel(II) und Zink(II).

Für DOTA-artige Liganden bieten sich die Lanthanoidionen an, die sehr stabile Komplexe mit vergleichbar hohen Komplexstabilitätskonstanten und sehr ähnlichen Molekulargewichten mit dieser Ligandklasse bilden (siehe Tabelle 2). Sie gleichen sich sehr stark in ihren chemischen Eigenschaften, und die Kontraktion des Ionenradius infolge der Massenzunahme hat im Fall der sehr gut untersuchten Lanthanoid-DOTA-Komplexe (DOTA = 1,4,7,10-Tetraazacyclododecan-1,4,7,10-Tetraessigsäure) nur einen verschwindend geringen Einfluß auf die kinetische Stabilität von Lanthanoidchelatkomplexen. Die hohe *in vivo* Stabilität dieser Verbindungen führte zur erfolgreichen Anwendung des DOTA-Gadolinium(III)-Komplexes als Kontrastmittel in der Magnetresonanztomographie. Für *in vivo* Anwendungen ist die kinetische Stabilität des Komplexes weit wichtiger als ihre thermodynamische Stabilität. Ein inerter Komplex geht keine Ligand- oder Metallaustauschreaktionen ein, selbst wenn die thermodynamische Stabilitätskonstante nicht sehr hoch ist. Ein Grund dafür, daß DOTA-Lanthanoid-Komplexe sowohl sehr stabil als auch inert sind, ist das optimale Größenverhältnis zwischen dem Metallion und dem vom Liganden zur Verfügung gestellten Hohlraum. Metallion und Ligand sind ein starres, gut abgeschlossenes Gebilde, das unter physiologischen Bedingungen extrem langsam dissoziiert und erst im sauren Medium durch Protonen angreifbar ist. $[\text{Gd}(\text{DOTA})(\text{H}_2\text{O})]^-$ besitzt eine Halbwertszeit von 200 Tagen in wäßriger Lösung bei einem p[H] von 5 und von 85 Tagen bei einem p[H] von 2. Die gut untersuchte Metallaustauschreaktion zwischen $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ und $[\text{Eu}(\text{DOTA})]^-$ im pH-Bereich 3,2-5,0 zeigt, daß der geschwindigkeitsbestimmende Schritt dieser Austauschreaktion die protonenassiierte Dissoziation von $[\text{Gd}(\text{DOTA})]^-$ ist. Selbst wenn eine Protonierung an den Acetatgruppen stattfindet, sind diese mono- und diprotonierten Komplexe nicht reaktiv, da sich das Metallion innerhalb des Koordinationskäfigs befindet. Um diesen zu zerstören, müssen die Protonen zu den N-Atomen transferiert werden. Dieser Prozeß geht nur sehr langsam über ein Rearrangement des gesamten Komplexes vonstatten. Auf der Basis dieser Untersuchung sind Metallaustauschreaktionen zwischen DOTA-Lanthanoid-Komplexen im relevanten pH- und

Zeitbereich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit auszuschließen.

Tabelle 1. Stabilitätskonstanten, LD₅₀-Rate und Selektivitätsfaktor (K_{sel}) für ausgewählte Liganden.

Ligand	LD ₅₀ ^a	Log K _{sel}	Log K _{GdL}	Log K _{CaI}	Log K _{CuL}	Log K _{ZnL}
EDTA	0,3	4,23	17,7	10,61	18,78	16,5
DTPA-BP	2,8	5,32	16,83			
DTPA	5,6	7,04	22,46	10,75	21,38	18,29
DOTA	11	8,3	24,6	17,23	22,63	21,05
DO3A	7-9	4,13	21,0	11,74	22,87	19,26
HP-DO3A	12	6,95	23,8	14,83	22,84	19,37
DTPA-	17,8	9,04	16,85	7,17	13,03	12,04
BMA						

a) Intravenöse LD₅₀-Rate in Mäusen, mmol/kg

Tabelle 2: Stabilitätskonstanten (logK) von LnDOTA-Komplexen

	Relative Atom- Masse [g/Mol]	Log K _{LnDOTA} Log 1 M NaCl, 37°	Log K _{LnDOTA} Log 0,1M KCl, 25°	K _{LnDOTA} , andere Arbeiten
La	138,91	20,7	22,9	21,7 (0,1M KCL, 25°)
Ce	140,12	21,6	23,4	
Pr	140,91	22,4	23,0	
Nd	144,24	22,5	23,0	
Sm	150,36	23,3	23,0	
Eu	151,97	23,7	23,5	28,2 (1M NaCl, 20°C)
Gd	157,25	23,6	24,7	22,1 (1M NaCl, 25°C); 24,0 (0,1 M KCL, 25°C)
Tb	158,93	23,6	24,7	28,6 (1M NaCl, 20°C)
Dy	162,50	23,5	24,8	
Ho	164,93	23,5	24,5	

Er	167,26	23,5	24,4	
Tm	168,93	23,7	24,4	
Yb	173,04	24,0	25,0	
Lu	174,97	23,5	25,4	29,2 (1M NaCl, 25°C)

Die Entwicklung von makrocyclischen lanthanoidspezifischen Liganden erhielt seit dem Beginn der achtziger Jahre einen beachtlichen Aufschwung durch deren erfolgreiche medizinische Anwendung sowohl in der Therapie als auch in der Diagnostik. Ein von Lauffer et al. 1999 erschienenes Review über Gd(III)-Chelate als Kontrastmittel für die Magnetresonanztomographie (MRT) gibt in eindrucksvoller Weise eine Zusammenfassung über die wichtigsten Forschungsergebnisse des letzten Jahrzehnts wieder.

Ein wichtiger Aspekt der vorliegenden Erfindung ist die Synthese, Charakterisierung und anwendungsbezogene Untersuchung von dinuklearen makrocyclischen Lanthanoidchelatkomplexen, die als potentielle MRI-Kontrastmittel für die medizinische Diagnostik konzipiert wurden. Im Gegensatz zu den sehr gut untersuchten Lanthanoidkomplexen mit dem Liganden DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecan-1,4,7,10-tetraacetate) und von DOTA abgeleiteten Verbindungen sind sehr gut wasserlösliche und wasserstabile, mehrkernige makrocyclische Lanthanoidchelatkomplexe bisher nur in sehr begrenzter Zahl bekannt.

Mit dieser Zielstellung gelang es, zwei Liganden zu synthetisieren, 1,4,7,10,13,16,19,22-Oктаazacyclotetracosan-1,4,7,10,13,16,19,22-oktaessigsäure (OTEC) und 1,4,7,10,14,17,20,23-Oктаazacyclohexacosan-1,4,7,10,14,17,20,23-oktaessigsäure (OHEC), die in der Lage sind, mono- und dinukleare Lanthanoidkomplexe zu bilden. Ihre Existenz konnte mit Hilfe der FAB-Massenspektrometrie nachgewiesen werden. Als Highlight in der Koordinationschemie gelang die Bestimmung der Festkörperstrukturen der dinuklearen Chelatkomplexe des OHEC-Liganden (Ln = Y, La, Eu, Gd, Tb, Yb, Lu), die mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurden. Neben der Strukturinformation liefern die Röntgenanalysen Hinweise auf die Zahl der in erster Koordinationssphäre koordinierten Wassermoleküle, die einen wichtigen Beitrag zur Wirksamkeit des Kontrastmittels leisten. Wir haben festgestellt, daß die Größe des Ionenradius der Metalle die Konformation des Liganden im Komplex und somit auch die Eigenschaften als MRI-Kontrastmittel entscheidend mit beeinflußt.

Mittels dynamischer NMR Messungen haben wir die Konformationsgleichgewichte der Komplexe in Lösung untersucht. Für die Yttrium- und Europiumkomplexe von OHEC erfolgte der Nachweis der erfolgreichen Synthese zusätzlich mittels ein- und zweidimensionaler NMR-Methoden. Die mono- und dinuklearen Europiumkomplexe mit OHEC konnten polarographisch näher charakterisiert werden. Die Bestimmung der Relaxivität der Gd-Komplexe erfolgte durch NMRD-Messungen (nuclear magnetic relaxation dispersion). Wir haben Relaxivitäten ermittelt, die signifikant größer sind, als bei im klinischen Einsatz befindlichen Kontrastmitteln. Deshalb besteht die berechtigte Hoffnung, hier eine neue Klasse von potentiellen Kontrastmitteln mit verbesserten Eigenschaften für die medizinische Diagnostik in den Händen zu haben.

Die Erfindung soll nun im folgenden durch Beispiele unter bezug auf die beigefügten Zeichnungen weiter erläutert werden, ohne auf diese Beispiele begrenzt zu sein. Es zeigt

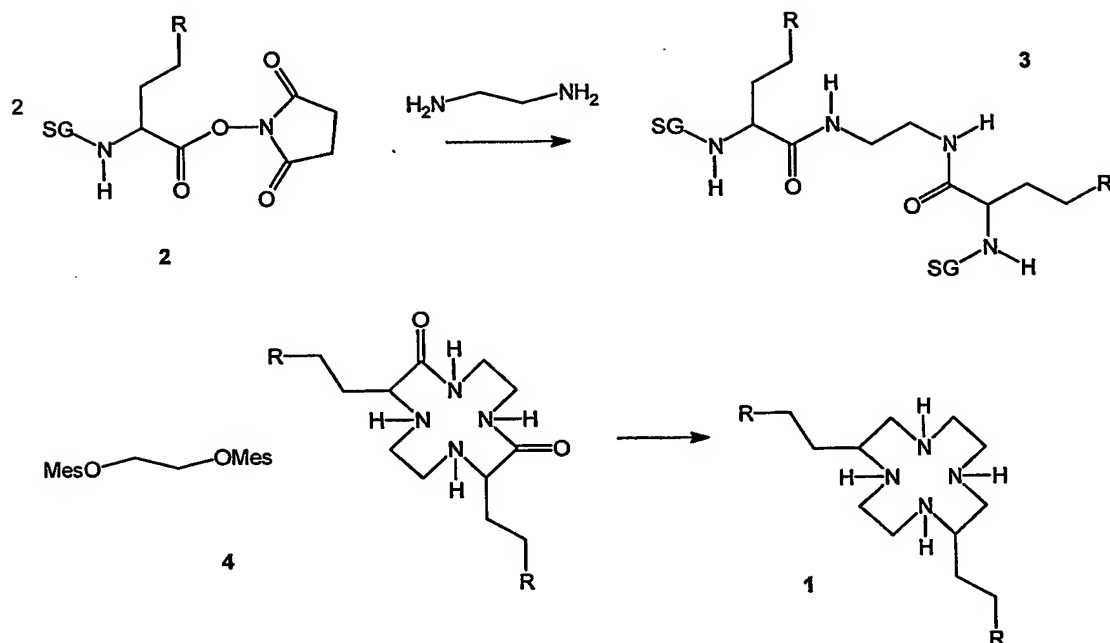
Figur 1 den Aufbau eines bei der MeCat verwendeten beispielhaften Reagenz. X ist entweder H oder eine Chelatgruppe.

Figur 2 die schematische Darstellung eines MeCAT-Verfahrens, mit 1) enzymatischer Spaltung; 2) Kopplung mit dem MeCAT-Reagenz; 3) Selektion der markierten Peptide; 4) Elution der selektierten Peptide; 5) Trennung der markierten Peptide; anschließend massenspektrometrische Analyse. * Hier können Probe A und B vereinigt werden.

Beispiele

Syntheseplanung – Vorarbeiten

Ziel der Synthese ist die Darstellung eines zweifach C-substituierten Tetraazamakrocyclus. Ausgehend von einem Amino-geschützten Lysin-Hydroxysuccinimidester (2) wird durch Umsetzung zweier Äquivalente mit einem Äquivalent Ethylendiamin das peptidisch verknüpfte Di-Lysin-Derivat (3) erhalten. Die Entschützungen zweier Aminofunktionen liefert die eine Komponente für die Cyclisierungsreaktion, die Mesylierung von Ethylenglycol die andere. In einer anschließenden [1+1]-Cyclokondensation erhält man den zweifach C-substituierten Tetraazadicarbonyl-Cyklus (4). Durch Reduktion der beiden Carbonyl-Funktionen gewinnt man letztlich den Tetraazacyclus (1), der an den beiden Seitenketten noch weiter funktionalisiert werden kann.



Versuchskonzept:

Ziel dieser Versuche war die Synthese und Anwendung von neuen funktionalen Markern zur Identifizierung und Quantifizierung von Zellproteinen. Die Marker sollten 1. sich an spezifische Aminosäuregruppen denaturierter Proteine binden lassen, 2. sich mittels Affinitätschromatographie und anderer Trennmethode aus einem großen Peptidpool isolieren lassen und 3. eine Identifizierung und Quantifizierung der Stammproteine anhand markierter Peptidfragmente mittels Massenspektrometrie und Datenbankanalyse erlauben.

Dafür galt es, folgende Bausteine in einem Molekül zu vereinen:

1. eine aminosäurespezifische oder sulhydrylspezifische Gruppe, z.B. eine Amin-reaktiven Pentafluorphenylestergruppe, eine Amin-reaktive N-Hydroxysuccinimidestergruppe, Sulfonylhalid, Isocyanat, Isothiocyanat, aktiver Ester, Tetrafluorphenylester, ein Säurehalid und ein Säureanhydrid, eine Homoserin Lacton-reaktive primäre Aminogruppe, und ein Carboxylsäure-reaktives Amin, Alkohol oder 2,3,5,6-Tetrafluorphenyltrifluoracetat, eine Jodacetylamidgruppe, ein Epoxid, eine α -Haloacylgruppe, ein Nitril, ein sulfoniertes Alkyl, ein Arylthiol oder ein Maleimid, die selektiv mit einer funktionellen Gruppe im Protein, in die-

sem Beispiel mit SH-Gruppen im Cystein, reagiert oder eine funktionelle Gruppe, die mit einer Proteinbindungsstelle in Wechselwirkung tritt (Ligand-Rezeptor-WW),

2. Reaktive Gruppen zur Bindung an ein Trägermaterial (z.B. zur Bindung des Komplexes an ein Säulenmaterial und anschließendes Binden an Peptide) oder Biotin oder andere aus der Affinitätschromatographie bekannte Moleküle, die zwecks Abtrennung der markierten Peptide an ein entsprechendes Gegen-Reagenz gebunden wurden und im Anschluß an den Trennungsgang wieder leicht vom Restmolekül abspaltbar waren, wobei reaktive Gruppen aus Säurehalogeniden, Aldehyden, Isocyanatderivaten, Succinimid-Derivaten, Imidazolyl-Carbamat-Derivaten, Traut's Reagenz-Derivaten, Sulfonsäurechlorid-Derivaten, Oxiran-Derivaten, Imidaten, Hydrazinen, Sulfosuccinimidyl-Derivaten, Diimid-Derivaten, Maleimid-Derivaten und 7-Sulfobenzofurazan-Derivaten ausgewählt sein können.

3. das Kernstück der neuen Marker, ein Makrocyclus, der Metallkomplexe hoher kinetischer und thermodynamischer Stabilität ausbildet.

Diese Marker wurden auf ihre Eignung in der Proteomanalytik, die sich die Leistungsfähigkeit der modernen Massenspektrometrie zunutze macht, untersucht. Dazu diente ein Testgemisch aus 5-10 Proteinen sowie eine Reihe von „real life samples“.

Generelle Vorgehensweise:

Das Kernstück der vorgeschlagenen Marker sind Makrocyclen auf der Basis von Polyazapolyessigsäuren (DOTA/NOTA), deren Metallkomplexe die geforderte Stabilität aufweisen. Diese Makrocyclen galt es in ausreichender Menge zu synthetisieren und dabei mit ein bzw. zwei Bindungsstellen für die weiteren Bausteine der Marker auszustatten bzw. die Makrocyclen über einen geeigneten Linker mit den übrigen MeCAT Komponenten zu verknüpfen. Die bevorzugte Methode geht von Aminosäuren aus, wobei die Einführung der Me-CAT Komponenten an C-Atome des Macrocyclus erfolgt. Bei einer alternativen Methode wird der Macrocyclus mit den übrigen MeCAT Komponenten über einen geeigneten Linker verknüpft. In einer dritten Methode erfolgt die Synthese gemäß der Festphasenpeptidsynthese an einem Peptidsynthesizer und anschließendem intramolekularen Tosylamidringschluß. Die MeCAT Reagenzien waren wiederum an C-Atome des Azamacrocyclus gebunden. Die Reinigung der Peptide erfolgte mittels präparativer HPLC.

Die Liganden wurden mit dreiwertigen Lanthanoidionen komplexiert, umfassend charakterisiert und auf ihre Eignung als MeCAT Reagenzien mit den gewünschten Eigenschaften getestet. Folgende Anforderungen wurden an das Reagenz gestellt:

- Die Komplexe müssen ausreichend kinetisch stabil sein, d.h. Metallaustauschreaktionen sollten vernachlässigbar klein sein.
- Diese Kodierungstechnik mit verschiedenen Metallionen diene als interne Standardmethode, um die relative Konzentration der unterschiedlich markierten Komponenten aus verschiedenen Proben zu bestimmen. Deshalb mußten die chemischen und physikalischen Eigenschaften der MeCAT-Reagenzien mit verschiedenen Metallionen u. a. hinsichtlich der Reaktion mit den Proteinen und ihres chromatographischen Trennverhaltens möglichst weitgehend identisch sein.
- Die Molmasse sollte die des ICAT Reagenzes nicht wesentlich übersteigen.

Folgende Untersuchungen wurden dann durchgeführt:

- a) Charakterisierung der MeCAT Reagenzien mittels MS und NMR;
- b) Test der aminosäurespezifischen bzw. substratspezifischen Bindungseigenschaften der MeCAT-Reagenzien und des Verhaltens der markierten Peptide im Massenspektrometer anhand eines kleinen ca. 10 Peptide enthaltenden Substanzpools;
- c) systematische Untersuchung und Optimierung des Verhaltens der markierten und unmarkierten Peptide in der Affinitätschromatographie und anderen chromatographischen Trennverfahren (Ionenaustauschchromatographie, RP-Chromatographie), insbesondere Untersuchung der Reproduzierbarkeit und der Wiederfindungsrate der markierten Peptide
- d) Nachweis der Reproduzierbarkeit des mittels geeigneten massenspektrometrischen Methoden bestimmten relativen Konzentrationsverhältnissen der mit unterschiedlichen Metallionen markierten und sonst chemisch identischen Peptide anhand des relativen Signalintensitätsverhältnisses der entsprechend zusammengehörigen Peptidpeaks im Massenspektrum
- e) Untersuchung der Eigenschaften der MeCAT Reagenzien an Realproben.

Darstellung geeigneter Linker sowie deren Verknüpfung mit den MeCat-Komponenten

- a) Der Linker wurde mit einer Biotineinheit zur Bindung an Avidin verknüpft.
- b) Der Linker wurde mit Glycin verknüpft zur kovalenten Bindung über Isothiocyanat- Gruppen an eine chromatographische Säule. Damit die unmarkierten Peptide die Säule ungehindert passieren können, mußten in diesem Fall zuvor sämtliche Aminogruppen mit Phenylisothiocyanat derivatisiert werden.

- c) Der Linker wurde mit einer Jodessigsäureeinheit zur selektiven Markierung cysteinhaltiger Peptide verknüpft.
- d) Der Linker wurde mit einer Succinsäureanhydrideinheit zur Markierung aminhaltiger Peptide verknüpft.

Literaturverzeichnis:

- F. Sanger, Nature 1977, 265, 687.
- V. C. Wasinger, S. J. Cordwell, A. Cerpa-Poljak, J. X. Yan, A. A. Gooley, M. R. Wilkins, M. W. Duncan, R. Harris, K. L. Williams, I. Humphery-Smith, Elektrophoresis 1995, 16, 1090.
- J.E. Celis, Electrophoresis 1990, 11, 989.
- K. B. Mullis, F. A. Faloon, Methods Enzymol. 1987, 155, 335.
- A. J. Link, Electrophoresis 1997, 18, 1314.
- A. e. a. Shevchenko, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 1440,
- D. Figeys, Electrophoresis 1998, 19, 1811.
- D. R. e. a. Goodlett, Anal. Chem. 2000, 72, 1112.
- K. L. Williams, Electrophoresis 1999, 20, 678.
- M. Quadroni, P. James, Electrophoresis 1999, 20, 664.
- I. Humphery-Smith, S. J. Cordwell, W. P. Blackstock, Electrophoresis 1997, 18, 1217.
- R. H. Aebersold, M. H. Gelb, S. P. Gygi, C. R. Scott, F. Turecek, S. Gerber, B. Rist, in PCT/US99/19415.
- P. S. Gygi, B. Rist, S. A. Gerber, F. Turecek, M. H. Gelb, R. Aebersold, Nature Biotechnology 1999, 17, 994.
- D. F. Hunt, J. R. Yates, J. Shabanowitz, S. Winston, C. R. Hauer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1986, 83, 6233.
- C. S. Spahr, S. A. Susin, E. J. Bures, J. H. Robinson, M. T. Davis, M. D. McGinley, G. Kroemer, S. D. Patterson, Electrophoresis 2000, 21, 1635.
- S. P. Gygi, B. Rist, T. J. Griffin, J. Eng, R. Aebersold, Journal of Proteome Research 2002.
- T. J. Griffin, D. K. M. Han, S. P. Gygi, B. Rist, H. Lee, R. Aebersold, K. C. Parker, Journal of the American Society for Mass Spectrometry 2001, 12, 1238.
- B. J. M. B. Smolka, H. Zhou, S. Purkayastha, R. Aebersold, Anal. Biochem. 2001, 297, 25
- D. K. Han, J. Eng, H. Zhou, R. Aebersold, Nature Biotechnology 2001, 19, 946.
- T. J. Griffin, S. P. Gygi, B. Rist, R. Aebersold, A. Loboda, A. Jilkine, W. Ens, K. G. Standing, Anal. Chem. 2001, 73, 978.

- R. Zhang, F. E. Regnier, Journal of Proteome Research 2002.
- X. Wang, T. Jin, V. Comblin, A. Lopez-Mut, M. E., J. F. Desreux, Inorg. Chem. 1992, 31, 1095.
- G. R. Choppin, K. M. Schaab, Morg. Chim Acta 1996, 252, 299.
- A. E. Martell, R. J. Motekaitis, E. T. Clarke, R. Delgado, Y. Sun, R. Ma, Supramolecular Chemistry 1996, 6, 353.
- R. Delgado, J. J. R. Frausto Da Silva, Talanta 1982, 29, 815,
- E. Töth, E. Brücher, I. Lazar, I. Toth, Inorg. Chem. 1994, 33, 4070.
- P. Caravan, J. J. Ellison, T. J. McMunry, R. B. Lauffer, Chem. Rev. 1999, 99, 2293.
- W. P. Cacheris, S. C. Ouay, S. M. Rocklage, Magnetic Resonance Imaging 1990, 8, 467.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und Quantifizierung von einem oder mehreren Proteinen in einer Probe, die ein Gemisch von Proteinen enthält, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt von:

- a) Zur Verfügung stellen einer Probe, die ein Gemisch von Proteinen enthält;
- b) Zur Verfügung stellen eines Reagenz zur Analyse von Peptiden, das die allgemeine Formel



aufweist, worin

A mindestens eine funktionelle Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial darstellt,

Y eine Gruppe ist, die mindestens eine Chelatfunktion für isotopenarme Metalle umfaßt, und

PRG eine reaktive Gruppe zur selektiven Bindung an Peptide oder andere zu analysierende Biomoleküle ist;

- c) Spaltung der Proteine in der Probe, um Peptide zu erzeugen;
 - d) Kopplung der Peptide mit dem Reagenz aus Schritt b)
 - e) Selektion der in Schritt d) markierten Peptide unter der Verwendung einer funktionellen Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial und Entfernung von nicht-gebundenen Peptiden;
 - f) Freisetzen der gebundenen Peptide von dem Trägermaterial und Elution von der Matrix; und
 - g) Nachweisen und Identifizieren der markierten Peptide durch Massenspektrometrie.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Spaltung der Peptide enzymatisch oder chemisch durchgeführt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die markierten Peptide nach der Freisetzung von dem Trägermaterial und vor ihrer massenspektrometrischen Analyse voneinander getrennt werden, insbesondere durch HPLC.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß mehrere Protein- und/oder Peptide enthaltende Proben gemeinsam analysiert werden.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, weiterhin umfassend die Sequenzierung der markierten Peptide.
6. Verfahren zum Nachweis der relativen Expression von Proteinen in einer Proteine enthaltenden Probe, wobei das Verfahren die Schritte umfaßt von
 - a) Zur Verfügung stellen einer biologischen Probe, die Proteine enthält;
 - b) Zur Verfügung stellen eines Reagenz zur Analyse von Peptiden, das die allgemeine Formel

A-Y-PRG

aufweist, worin

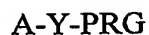
A mindestens eine funktionelle Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial darstellt,

Y eine Gruppe ist, die mindestens eine Chelatfunktion für isotopenarme Metalle umfaßt, und

PRG eine reaktive Gruppe zur selektiven Bindung an Peptide oder andere zu analysierende Biomoleküle ist;

- c) Spaltung der Proteine in der Probe, um Peptide zu erzeugen;
- d) Kopplung der Peptide mit dem Reagenz aus Schritt b)
- e) Selektion der in Schritt d) markierten Peptide unter der Verwendung einer funktionellen Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial und Entfernung von nicht gebundenen Peptiden;
- f) Freisetzen der gebundenen Peptide von dem Trägermaterial und Elution von der Matrix; und
- g) Nachweisen und Identifizieren der markierten Peptide mittels Massenspektrometrie, und

- h) Messen der relativen Anwesenheit der verschieden markierten Peptide als getrennte Ionenpeaks, um die relative Expression des Proteins zu bestimmen, von dem das affinitätsmarkierte Peptid abstammt.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Anordnung der Gruppen A, X und PRG vertauscht ist.
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die markierten Peptide mittels Tandem-Techniken, wie zum Beispiel matrixassistierte Laser-desorptions/Ionisations (MALDI) time-of-flight (TOF)-TOF-MS und die Elektrospray-ionisations-(ESI)-MS nachgewiesen werden.
9. Reagenz für die massenspektroskopische Analyse von Peptiden, das die allgemeine Formel:



aufweist, worin

A mindestens eine funktionelle Gruppe zur reversiblen, kovalenten oder nicht-kovalenten Bindung an ein Trägermaterial darstellt,

Y eine Gruppe ist, die mindestens eine Chelatfunktion für isotopenarme Metalle umfaßt, und

PRG eine reaktive Gruppe zur selektiven Bindung von Peptiden oder anderen zu analysierenden Biomolekülen ist, die analysiert werden sollen.

10. Reagenz nach Anspruch 9, wobei die Anordnung der Gruppen A, Y und PRG vertauscht ist.
11. Reagenz nach Anspruch 10 oder 11, worin PRG ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer Sulfhydryl-reaktiven Gruppe, einer Amin-reaktiven Gruppe und einem Enzymsubstrat.
12. Reagenz nach Anspruch 11, wobei PRG ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einer Amin-reaktiven Pentafluorphenylestergruppe, einer Amin-reaktiven N-

Hydroxysuccinimidestergruppe, Sulfonylhalid, Isocyanat, Isothiocyanat, aktivem Ester, Tetrafluorphenylester, einem Säurehalid und einem Säureanhydrid, einer Homoserin Lacton-reaktiven primären Amingruppe, und einem Carboxylsäure-reaktiven Amin, Alkohol oder 2,3,5,6-Tetrafluorphenyltrifluoracetat, einer Jodacetylamidgruppe, einem Epoxid, einer α -Haloacylgruppe, einem Nitril, einem sulfonierten Alkyl, einem Arylthiol und einem Maleimid.

13. Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 12, worin A ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Biotin oder modifiziertem Biotin, einem 1,2-Diol, Glutathion, Maltose, einer Nitrilotriessigsäuregruppe, einem Oligohistidin und einem Hapten oder anderen reaktiven Reagenzien, die eine reversible Bindung an ein Trägermaterial ermöglichen.
14. Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 13, weiterhin umfassend einen chemisch und/oder enzymatisch und/oder durch Strahlen- oder Lichteinwirkung spaltbaren Linker zwischen den Gruppen A, Y und/oder PRG.
15. Reagenz nach Anspruch 14, wobei der Linker eine Disulfidgruppe enthält.
16. Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 15, worin Y ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus einem makrozyklischen Lanthanoid-Chelatkomplex, einem funktionalisierten Tetraazamacrozyklus, einer Polyazapolyessigsäure, DOTA, einem DOTA-Derivat, NOTA, einem NOTA-Derivat, 1,4,7,10,13,16,19,22-Oktaazacyclotetracosan-1,4,7,10,13,16,19,22-oktaessigsäure (OTEC), 1,4,7,10,14-17,20,23-Oktaazacyclohexacosan-1,4,7,10,14,17,20,23-oktaessigsäure (OHEC), EDTA, DTPA-BP, DTPA, DO3A, HP-DO3A und DTPA-BMA.
17. Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 16, wobei das durch den Chelatkomplex gebundene Metall ausgewählt ist aus Ag, Al, As, Au, Be, Cd, Ce, Co, Cr, Cu, Dy, Er, Eu, Fe, Gd, Hg, Ho, In, La, Li., Lu, Mn, Na, Nd, Ni, Pb, Pr, Rb, Rd, Sb, Sm, Sn, Tb, Tl, Tm, V, W, Y, Yb und Zn.
18. Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 17, wobei die chelatbildende Gruppe mit mehreren verschiedenen Metallen markiert ist.

19. Verwendung eines Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zum Nachweis von Peptiden in einer biologischen Probe und/oder der relativen Expression von Proteinen in einer Proteine enthaltenden Probe.
20. Verwendung eines Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zur Diagnose von Erkrankungen eines Tieres, insbesondere des Menschen, durch Nachweis der relativen Expression von Proteinen in einer von dem Tier entnommenen und Proteine enthaltenden Probe.
21. Diagnostischer Kit, enthaltend ein Reagenz nach einem der Ansprüche 9 bis 17 zusammen mit weiteren zum Nachweis von Peptiden in einer biologischen Probe und/oder der relativen Expression von Proteinen in einer Proteine enthaltenden Probe geeigneten Substanzen und/oder Enzymen, insbesondere einen internen Standard.

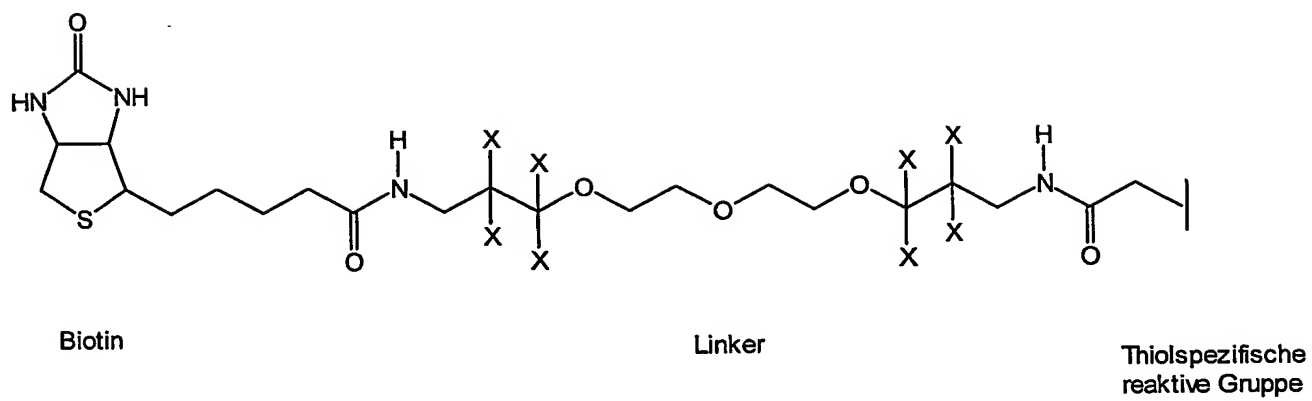
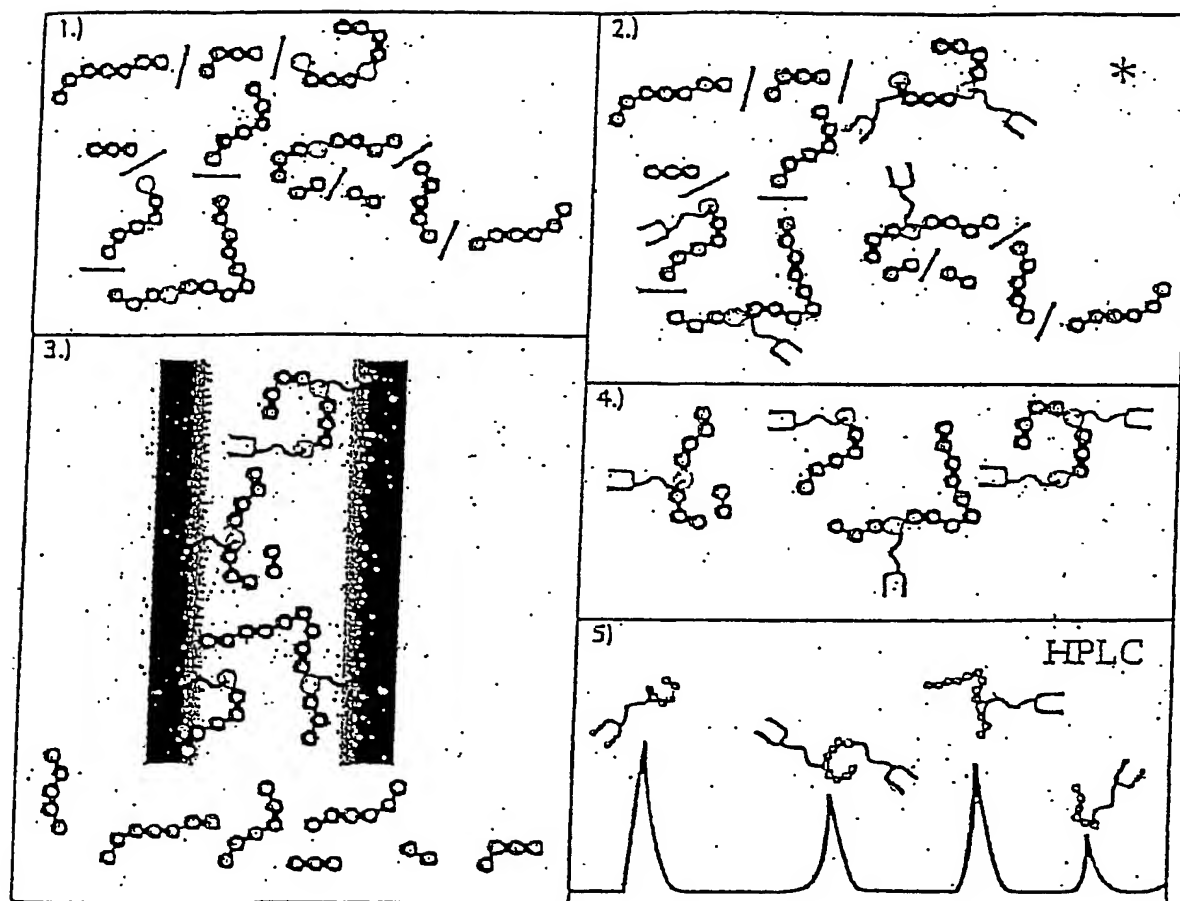
Fig. 1

Fig. 2



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
31. Dezember 2003 (31.12.2003)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/001420 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**, 33/531
- (74) Anwälte: **KRAUSS, Jan** usw.; Boehmert & Boehmert, Meinekestrasse 26, 10719 Berlin (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP2003/006391**
- (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (22) Internationales Anmeldedatum:
17. Juni 2003 (17.06.2003)
- (25) Einreichungssprache: **Deutsch**
- (26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**
- (30) Angaben zur Priorität:
102 27 599.8 20. Juni 2002 (20.06.2002) **DE**
- (84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **PROTEOME FACTORY AG** [DE/DE]; Dorotheenstrasse 94, 10117 Berlin (DE).
- (72) Erfinder; und
- (75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN** [DE/DE]; Unter den Linden 6, 10099 Berlin (DE). **KRAUSE, Martin** [DE/DE]; Wielandstrasse 44, 10625 Berlin (DE). **SCHELER, Christian** [DE/DE]; Teltower Damm 227B, 14167 Berlin (DE). **BÖTTGER, Ulrike** [DE/DE]; Mühlbergstrasse 15, 12487 Berlin (DE). **WEISSHOFF, Hardy** [DE/DE]; Gürtelstrasse 10, 13088 Berlin (DE). **LINSCHIED, Michael** [DE/DE]; Lipaer Strasse 12 a, 12203 Berlin (DE).
- Veröffentlicht:
— *mit internationalem Recherchenbericht*
- (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: **4. März 2004**
- Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: **METHOD AND REAGENT FOR SPECIFICALLY IDENTIFYING AND QUANTIFYING ONE OR MORE PROTEINS IN A SAMPLE**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND REAGENZ ZUR SPEZIFISCHEN IDENTIFIZIERUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON EINEM ODER MEHREREN PROTEINEN IN EINER PROBE**

(57) Abstract: The invention relates to the MeCAT (metal chelate complex-coded affinity tag) method, and to a reagent suited for carrying out this method. Said reagent contains a reproducible systematic, qualitative and quantitative proteomic characterization with the aid of non-isotope metal-coded markers and, among other things, the latest mass spectrometric tandem methods.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft das MeCAT (Metal-chelate-complex-coded-affinity-tag) Verfahren und ein zu dessen Durchführung geeignetes Reagenz, das eine reproduzierbare systematische, qualitative und quantitative Proteomcharakterisierung mit Hilfe von nicht-Isotop metallkodierten Markern und u.a. modernsten massenspektrometrischen Tandem-Methoden beinhaltet.

WO 2004/001420 A3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
EP 03/06391

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 G01N33/531

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	T ET AL: "Reversible oriented immobilization of histidine-tagged proteins on gold surfaces using a chelator thioalkane" SUPRAMOLECULAR SCIENCE, OXFORD, GB, vol. 2, no. 3/4, 1995, pages 155-160, XP002082734 ISSN: 0958-5677 page 155 -page 160 ---	1-21
X	WO 00 47548 A (WILKINSON MATTHEW PETER ;UNIV SYDNEY (AU); YING PING (AU); AU MEMB) 17 August 2000 (2000-08-17) the whole document --- -/--	1-21

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 November 2003

Date of mailing of the international search report

16/12/2003

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Pinheiro Vieira, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No
EP 03/06391

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>ARMISEN P ET AL: "Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 848, no. 1-2, 2 July 1999 (1999-07-02), pages 61-70, XP004184200 ISSN: 0021-9673 the whole document</p> <p>---</p>	1-21
X	<p>PORATH J: "IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY CHROMATOGRAPHY" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US, vol. 3, no. 4, August 1992 (1992-08), pages 263-281, XP001098444 ISSN: 1046-5928 the whole document</p> <p>---</p>	1-21
X	<p>US 5 958 783 A (OFENLOCH-HAEHNLE BEATUS ET AL) 28 September 1999 (1999-09-28) the whole document</p> <p>---</p>	9-21
Y	<p>WO 00 57183 A (BIOVATION LTD ;CARR FRANCIS J (GB)) 28 September 2000 (2000-09-28) the whole document</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>US 6 087 452 A (HO CHIH-HU ET AL) 11 July 2000 (2000-07-11) the whole document</p> <p>---</p>	1-21
Y	<p>GYGI S P ET AL: "QUANTITATIVE ANALYSIS OF COMPLEX PROTEIN MIXTURES USING ISOTOPE-CODED AFFINITY TAGS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, vol. 17, no. 10, October 1999 (1999-10), pages 994-999, XP001010578 ISSN: 1087-0156 the whole document</p> <p>-----</p>	1-21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

EP 03/06391

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0047548	A	17-08-2000	WO 0047548 A1 17-08-2000
		AU 2648500 A	29-08-2000
		CA 2341348 A1	17-08-2000
		CN 1345301 T	17-04-2002
		EP 1150942 A1	07-11-2001
		JP 2002536428 T	29-10-2002
US 5958783	A	28-09-1999	DE 4430998 A1 01-02-1996
			DE 4439347 A1 01-02-1996
			DE 4439345 A1 01-02-1996
			AT 187732 T 15-01-2000
			AT 193294 T 15-06-2000
			AT 214073 T 15-03-2002
			AU 682278 B2 25-09-1997
			AU 3164995 A 22-02-1996
			AU 689626 B2 02-04-1998
			AU 3165095 A 22-02-1996
			AU 688953 B2 19-03-1998
			AU 3220495 A 22-02-1996
			AU 690315 B2 23-04-1998
			AU 3220595 A 22-02-1996
			AU 684992 B2 08-01-1998
			AU 3220695 A 22-02-1996
			CA 2172144 C 06-02-2001
			CA 2172145 A1 08-02-1996
			CA 2195648 A1 08-02-1996
			CA 2195752 A1 08-02-1996
			CA 2195753 A1 08-02-1996
			CN 1130910 A 11-09-1996
			CN 1134154 A ,B 23-10-1996
			CN 1152923 A ,B 25-06-1997
			CN 1161745 A ,B 08-10-1997
			CN 1157655 A 20-08-1997
			DE 4430972 A1 01-02-1996
			DE 4430973 A1 01-02-1996
			DE 4439346 A1 01-02-1996
			DE 59507438 D1 20-01-2000
			DE 59508391 D1 29-06-2000
			DE 59510092 D1 11-04-2002
			WO 9603650 A1 08-02-1996
			WO 9603651 A1 08-02-1996
			WO 9603652 A1 08-02-1996
			WO 9603409 A1 08-02-1996
			WO 9603423 A1 08-02-1996
			WO 9603410 A1 08-02-1996
			EP 0772616 A1 14-05-1997
			EP 0774119 A1 21-05-1997
			EP 0774120 A1 21-05-1997
			EP 0772774 A1 14-05-1997
			EP 0720614 A1 10-07-1996
			EP 0723551 A1 31-07-1996
			ES 2143059 T3 01-05-2000
			ES 2148540 T3 16-10-2000
			ES 2171190 T3 01-09-2002
			FI 961349 A 25-03-1996
			FI 961350 A 25-03-1996
			FI 970299 A 24-01-1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
/EP 03/06391

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0057183	A	28-09-2000	AU 3307300 A	09-10-2000
			BR 0009206 A	26-12-2001
			CA 2366559 A1	28-09-2000
			CN 1344370 T	10-04-2002
			CZ 20013399 A3	16-01-2002
			EP 1163519 A1	19-12-2001
			WO 0057183 A1	28-09-2000
			HU 0200400 A2	29-05-2002
			NO 20014584 A	19-11-2001
			PL 350318 A1	02-12-2002
			SK 13242001 A3	10-09-2002
<hr/>				
US 6087452	A	11-07-2000	NONE	
<hr/>				

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
EP 03/06391

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 G01N33/68 G01N33/531

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)
BIOSIS, EPO-Internal, WPI Data, MEDLINE, CHEM ABS Data, EMBASE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	T ET AL: "Reversible oriented immobilization of histidine-tagged proteins on gold surfaces using a chelator thioalkane" SUPRAMOLECULAR SCIENCE, OXFORD, GB, Bd. 2, Nr. 3/4, 1995, Seiten 155-160, XP002082734 ISSN: 0958-5677 Seite 155 -Seite 160 ---	1-21
X	WO 00 47548 A (WILKINSON MATTHEW PETER ;UNIV SYDNEY (AU); YING PING (AU); AU MEMB) 17. August 2000 (2000-08-17) das ganze Dokument --- -/--	1-21

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

& Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

28. November 2003

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

16/12/2003

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Pinheiro Vieira, E

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	ARMISEN P ET AL: "Selective adsorption of poly-His tagged glutaryl acylase on tailor-made metal chelate supports" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, Bd. 848, Nr. 1-2, 2. Juli 1999 (1999-07-02), Seiten 61-70, XP004184200 ISSN: 0021-9673 das ganze Dokument ----	1-21
X	PORATH J: "IMMOBILIZED METAL ION AFFINITY CHROMATOGRAPHY" PROTEIN EXPRESSION AND PURIFICATION, ACADEMIC PRESS, US, Bd. 3, Nr. 4, August 1992 (1992-08), Seiten 263-281, XP001098444 ISSN: 1046-5928 das ganze Dokument ----	1-21
X	US 5 958 783 A (OFENLOCH-HAEHNLE BEATUS ET AL) 28. September 1999 (1999-09-28) das ganze Dokument ----	9-21
Y	WO 00 57183 A (BIOVATION LTD ;CARR FRANCIS J (GB)) 28. September 2000 (2000-09-28) das ganze Dokument ----	1-21
Y	US 6 087 452 A (HO CHIH-HU ET AL) 11. Juli 2000 (2000-07-11) das ganze Dokument ----	1-21
Y	GYGI S P ET AL: "QUANTITATIVE ANALYSIS OF COMPLEX PROTEIN MIXTURES USING ISOTOPE-CODED AFFINITY TAGS" NATURE BIOTECHNOLOGY, NATURE PUBLISHING, US, Bd. 17, Nr. 10, Oktober 1999 (1999-10), Seiten 994-999, XP001010578 ISSN: 1087-0156 das ganze Dokument -----	1-21

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen

/EP 03/06391

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0047548	A	17-08-2000	WO 0047548 A1	17-08-2000
			AU 2648500 A	29-08-2000
			CA 2341348 A1	17-08-2000
			CN 1345301 T	17-04-2002
			EP 1150942 A1	07-11-2001
			JP 2002536428 T	29-10-2002
US 5958783	A	28-09-1999	DE 4430998 A1	01-02-1996
			DE 4439347 A1	01-02-1996
			DE 4439345 A1	01-02-1996
			AT 187732 T	15-01-2000
			AT 193294 T	15-06-2000
			AT 214073 T	15-03-2002
			AU 682278 B2	25-09-1997
			AU 3164995 A	22-02-1996
			AU 689626 B2	02-04-1998
			AU 3165095 A	22-02-1996
			AU 688953 B2	19-03-1998
			AU 3220495 A	22-02-1996
			AU 690315 B2	23-04-1998
			AU 3220595 A	22-02-1996
			AU 684992 B2	08-01-1998
			AU 3220695 A	22-02-1996
			CA 2172144 C	06-02-2001
			CA 2172145 A1	08-02-1996
			CA 2195648 A1	08-02-1996
			CA 2195752 A1	08-02-1996
			CA 2195753 A1	08-02-1996
			CN 1130910 A	11-09-1996
			CN 1134154 A ,B	23-10-1996
			CN 1152923 A ,B	25-06-1997
			CN 1161745 A ,B	08-10-1997
			CN 1157655 A	20-08-1997
			DE 4430972 A1	01-02-1996
			DE 4430973 A1	01-02-1996
			DE 4439346 A1	01-02-1996
			DE 59507438 D1	20-01-2000
			DE 59508391 D1	29-06-2000
			DE 59510092 D1	11-04-2002
			WO 9603650 A1	08-02-1996
			WO 9603651 A1	08-02-1996
			WO 9603652 A1	08-02-1996
			WO 9603409 A1	08-02-1996
			WO 9603423 A1	08-02-1996
			WO 9603410 A1	08-02-1996
			EP 0772616 A1	14-05-1997
			EP 0774119 A1	21-05-1997
			EP 0774120 A1	21-05-1997
			EP 0772774 A1	14-05-1997
			EP 0720614 A1	10-07-1996
			EP 0723551 A1	31-07-1996
			ES 2143059 T3	01-05-2000
			ES 2148540 T3	16-10-2000
			ES 2171190 T3	01-09-2002
			FI 961349 A	25-03-1996
			FI 961350 A	25-03-1996
			FI 970299 A	24-01-1997

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationaler Aktenzeichen
P/EP 03/06391

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 0057183 A	28-09-2000	AU 3307300 A	09-10-2000
		BR 0009206 A	26-12-2001
		CA 2366559 A1	28-09-2000
		CN 1344370 T	10-04-2002
		CZ 20013399 A3	16-01-2002
		EP 1163519 A1	19-12-2001
		WO 0057183 A1	28-09-2000
		HU 0200400 A2	29-05-2002
		NO 20014584 A	19-11-2001
		PL 350318 A1	02-12-2002
		SK 13242001 A3	10-09-2002
<hr/>			
US 6087452 A	11-07-2000	KEINE	
<hr/>			